

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
10. Jg. 1972, S. 555–561

Eine gaschromatographische Methode zur Bestimmung der Sekretionsrate und Exkretionsrate von Aldosteron¹⁾

Von O. WÖRSDÖRFER²⁾, G. DIEDRICHSEN und D. LOMMER

I. Medizinische Klinik und Poliklinik der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz

(Eingegangen am 4. Februar/3. August 1972)

Eine Methode zur gaschromatographischen Analyse von Aldosteron nach Säurehydrolyse im menschlichen Urin und deren Anwendung zur Bestimmung der Sekretionsrate und/oder Exkretionsrate des Hormones wird beschrieben. Parallelbestimmungen mit einer bewährten, klassischen Methode (Tetrazolium-Blau) ergaben übereinstimmende Ergebnisse. Die ermittelten Normalbereiche waren: Sekretionsrate = 144 ± 86 (2s) $\mu\text{g/d}$ ($n = 35$) und Exkretionsrate = $10,6 \pm 8,4$ (2s) $\mu\text{g/d}$ ($n = 35$). Die untere Nachweisgrenze der Methode lag bei $0,6 \mu\text{g/d}$, wenn die Hälfte eines 24-Stunden-Sammelurines aufgearbeitet wurde. Die Präzisionsprüfung ergab für die quantitative, gaschromatographische Analyse einen Variationskoeffizienten von 2,8% ($n = 90$), für die gesamte Methode Variationskoeffizienten von 11,8% (Pool-Urin, $n = 10$), bzw. 11,2% (Doppelbestimmungen aus Patienten-Urinen, $n = 48$). Die Proportionalitätsprüfung ergab zwischen ermittelten Aldosteronmengen und den eingesetzten Mengen eines Pool-Urines eine Korrelation von $r = 0,999$. Die Richtigkeit der Methode wurde anhand der Wiederfindung von $11 \mu\text{g}$ Aldosteron aus 1500 ml Wasser ($n = 6$) geprüft. Sie betrug $10,23 \pm 0,66$ (s) μg . Die gleichzeitige Bestimmung von Sekretions- und Exkretionsraten bei 122 Patienten ergab eine signifikante Korrelation ($r = 0,792$), obgleich 18 von 60 Patienten mit normaler Exkretionsrate eine erhöhte Sekretionsrate aufwiesen.

A gaschromatographic method for the estimation of secretion and excretion rates of aldosterone

A method for the analysis of aldosterone in acid hydrolyzed human urine, and its application for aldosterone secretion and/or excretion rate estimations are described. The results agreed with those of parallel estimations by means of a classical standard technique (blue tetrazolium). The normal ranges estimated were: secretion rate = 144 ± 86 (2s) $\mu\text{g/d}$ ($n = 35$), and excretion rate = 10.6 ± 8.4 (2s) $\mu\text{g/d}$ ($n = 35$). When one half of a complete 24 h urine was analyzed, the sensitivity of the method was $0.6 \mu\text{g/d}$. Examinations of the precision resulted in coefficients of variation of 2.8% ($n = 90$) for the quantitative, gaschromatographic analysis, and of 11.8% (pool-urine, $n = 10$) or 11.2% (double estimations from patient urines, $n = 48$) for the whole method. The correlation between the amounts of aldosterone found and the volumes of a pool urine analyzed was $r = 0.999$. The accuracy of the method was examined by analyzing 6 portions of 1500 ml water, each of which contained $11 \mu\text{g}$ aldosterone. Results were 10.23 ± 0.66 (s) μg . Concomitant estimations of secretion rate and excretion rate in 122 patients resulted in a significant correlation ($r = 0.792$), although 18 of 60 patients with normal excretion rate exhibited increased secretion rate.

MERITS (1) berichtete 1962 über die Möglichkeit, Aldosteron nach Oxidation mit Perjodsäure als 11 β -Hydroxy-3-keto-4-äthiensäure-18-al-18,11-hemiacetal-20, 18-lacton (im folgenden kurz als γ -Lacton bezeichnet) gaschromatographisch zu analysieren. Eine Reihe von Autoren (2–10) beschrieb in der Folgezeit entsprechende, gaschromatographische Methoden zur Bestimmung von Aldosteron in biologischen Flüssigkeiten.

In der vorliegenden Arbeit wird eine Methode zur Isolierung freien Aldosterons aus Urin nach Säurehydrolyse (Aldosteron-18-glucuronid + Aldosteron) und zu dessen quantitativ-gaschromatographischem Nachweis als γ -Lacton mittels Flammenionisationsdetektor beschrieben. Die Methode fand im Rahmen klinischer Untersuchungen praktische Anwendung in der Bestimmung der Aldosteronsekretions- und/oder -exkretionsraten nach dem Prinzip der Isotopenverdünnungsanalyse. Die Zuverlässigkeitskriterien der Methode wurden eingehend überprüft. Dazu wurden u. a. Paralleluntersuchungen mit einer bewährten, klassischen Technik (Tetrazolium-Blau) durchgeführt, die bereits seit 1963 (11) in der letzten Modifikation seit 1968 (12) in der Labordiagnostik angewandt wird.

Methodik

Chemikalien

D-Aldosteron: E. Merck. γ -Lacton: Eigene Herstellung durch Oxidation von D-Aldosteron mit Perjodsäure: Reinigung durch mehrfaches Umkristallisieren aus Methanol. [$1,2\text{-}^3\text{H}_2$]D-Aldosteron (30–50 Ci/mmol) und [$4\text{-}^{14}\text{C}$]D-Aldosteron (40–50 mCi/mmol): NEN Chemicals. Reagenzien und Lösungsmittel („zur Analyse“): E. Merck; alle Lösungsmittel wurden vor Gebrauch über 100 cm Glaskolonnen destilliert. Tetrazolium-Blau (3,3'-Dianisol-bis-4,4'-(3,5-diphenyl)-tetrazoliumchlorid, p. a.): Serva.

Geräte

Photometer Eppendorf mit Cadmiumlampe und Filter Cd 509 nm: Netheler & Hinz. Gaschromatograph Aerograph 2100 mit Flammenionisationsdetektor: Varian. Liquidscintillation Spectrometer Model 3380 mit Computer Model 544 und Radiochromatogram Scanner Model 7201: Packard Instruments.

Bestimmung der Aldosteronsekretions- und -exkretionsrate

Zur Bestimmung der Aldosteronsekretionsrate wurde den Probanden nach Entleerung der Blase zwischen 8 und 9 Uhr etwa

¹⁾ Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft und durch das Bundesministerium für Bildung und Wissenschaft.

²⁾ Auszug aus der Dissertation von Otto Wörsdörfer, Medizinische Fakultät der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 1972.

$10 \mu\text{Ci}$ [$1,2\text{-}^3\text{H}_2$]D-Aldosteron (gelöst in 1 ml Äthanol + 10 ml physiologischer NaCl-Lösung) quantitativ i. v. injiziert. Danach wurde der Urin über 72 h quantitativ gesammelt. Sollte aus dem Sammelurin gleichzeitig die Aldosteronexkretionsrate bestimmt werden, so wurde dieser mit etwa $0,05 \mu\text{Ci}$ [$4\text{-}^{14}\text{C}$]D-Aldosteron als Verlustindikator versetzt. Die gesamte Urinmenge wurde in zwei 1/3-Portionen zur Doppelbestimmung nach der Tetrazolium-Blau-Methode und zwei 1/6-Portionen zur Doppelbestimmung nach der gaschromatographischen Methode aufgeteilt. Zur Kontrolle der unspezifischen Blindwerte wurde mit jeder Urin-Doppelbestimmung ein entsprechendes Volumen destillierten Wassers aufgearbeitet. Die Proben wurden mit konzentrierter HCl auf pH 1,1 angesäuert und zur Hydrolyse des Aldosteron-18-glucuronids über 24 h bei Raumtemperatur gehalten. Danach folgte eine dreimalige Extraktion mit jeweils 1/5 des Probenvolumens an Chloroform. Die vereinigten Chloroformphasen wurden rasch mit jeweils 1/10 ihres Volumens an eiskalter 0,1 mol/l NaOH und anschließend mit destilliertem Wasser gewaschen. Das Lösungsmittel wurde bei 37°C im Rotationsverdampfer evaporiert. Zur ersten Chromatographie wurden die Rohextrakte mit wenig Chloroform auf dickes Chromatographiepapier (Macharey & Nagel, MN 212; $10 \text{ cm} \times 50 \text{ cm}$) aufgetragen. Die Papierstreifen wurden durch Eintauchen in Essigsäure-iso-amylester:Methanol:Wasser = 40:7:3 (v/v) bis dicht an die Startzone imprägniert. Nach 10 bis 15 min wurden sie in einen dicht schließenden, mit Essigsäure-iso-amylester gesättigten Chromatographietank (Shandon) gebracht und anschließend über 16 h im Durchlauf mit wassergesättigtem Essigsäure-iso-amylester entwickelt (Raumtemperatur). Referenzsubstanz: Isatin. Der R_{Isatin} -Wert des Aldosterons betrug im Mittel 0,45. Die exakte Lokalisation des Aldosterons erfolgte im Radiochromatogramm-Scanner. Nach Elution der Aldosteronbereiche mit Methanol und Evaporation des Lösungsmittels unterschied sich die weitere Aufarbeitung entsprechend der Art der quantitativen Auswertung (Tetrazolium-Blau-Methode oder Gaschromatographie) wie folgt:

1. Tetrazolium-Blau-Methode

a) Rechromatographie auf dünnem Papier (Whatman Nr. 1; $5 \text{ cm} \times 50 \text{ cm}$) einfach absteigend (4–5 h) nach 12 h Äquilibriumierung im System BUSH-B₅ (Benzol:Methanol:Wasser = 2:1:1 v/v). Elution der Aldosteronbereiche mit Methanol.

b) Acetylierung der sorgfältig getrockneten Eluate (0,1 ml wasserfreies Pyridin, 0,1 ml Essigsäureanhydrid, 12 h bei Raumtemperatur).

c) Chromatographische Isolierung des 18,21-Diacetoxy-aldosterons auf dünnem Papier (Whatman Nr. 1; $5 \text{ cm} \times 50 \text{ cm}$) im System Mesitylen:Methanol:Wasser = 9:7:3 v/v. Nach Imprägnierung der Papierstreifen mit der Mesitylenphase Entwicklung mit der Methanol-Wasser-Phase im Durchlauf über 16 h (Raumtemperatur). Referenzsubstanz: Rodamin-B. Mittlerer $R_{\text{Rodamin-B}}$ -Wert des Aldosterondiacetates: 0,4.

d) Rechromatographie auf Kieselgel-Dünnschicht (Macharey & Nagel, Polygram SIL G-UV 254; $2 \text{ cm} \times 20 \text{ cm}$ Streifen auf $20 \times 20 \text{ cm}^2$ Folien) im System Essigsäureäthylester:Aceton = 10:1 v/v einfach aufsteigend. Der mittlere R_F -Wert betrug 0,25.

e) Die getrockneten Eluate der Aldosterondiacetat-Zonen und der entsprechenden Leerwert-Zonen wurden in 1 ml Äthanol aufgenommen. Jeweils dreimal 0,05 ml dieser Lösung wurden in Szintillationsmeßgläsern übergeführt, eingengt, mit 10 ml Szintillatorlösung (4 g 2,5-Diphenyloxazol, 50 mg 1,4-bis-(2,5-Phenyloxazolyl)-benzol, mit Toluol ad 1000 ml) aufgenommen und im Flüssigkeitsszintillationsspektrometer auf ihren Gehalt an ^3H - und/oder ^{14}C -Radioaktivität analysiert. Je dreimal 0,2 ml der Äthanol-Lösung wurden mit 0,02 ml Tetramethylammoniumhydroxid-Lösung (1 ml 10proz. wäbr. Tetramethylammoniumhydroxid-Lösung + 9 ml Äthanol) und 0,02 ml 0,5proz. äthanolischer Tetrazolium-Blau-Lösung versetzt. Nach exakt 25 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,1 ml Eisessig abgestoppt. Die Extinktion des gebildeten Formazans (13) wurde bei 509 nm (E_{max} bei 510 nm) unter Verwendung von Mikroküvetten gegen Äthanol gemessen. Zu jeder Meßreihe wurde eine Eichkurve aus mindestens 5 Punkten erstellt, die stets linearen

Verlauf zeigte. Nach Leerwert-Korrektur wurden die jeweiligen Aldosteronmengen anhand der Eichkurve ermittelt.

2. Gaschromatographische Methode

a) Die Eluate wurden in je 0,2 ml einer 1proz. Lösung von H_2O_4 in Dioxan:Wasser = 1:1 aufgenommen. Nach 3 h bei Raumtemperatur wurde der Reaktionsansatz mit 2 ml Wasser versetzt und mit 10 ml Dichlormethan extrahiert. Der Extrakt wurde sorgfältig mit 2 ml 0,1 mol/l NaOH und anschließend bis zur Neutralität mit destilliertem Wasser gewaschen. Das Lösungsmittel wurde evaporiert.

b) Isolierung des γ -Lactons durch zweidimensionale Chromatographie auf Kieselgel-Dünnschicht (Polygram SIL G-UV 254; $20 \text{ cm} \times 20 \text{ cm}$): 1. Lauf mit Hexan:Benzol:Essigsäureäthylester = 1:4:7 (v/v). Der R_F -Wert des γ -Lactons betrug im Mittel 0,48. 2. Lauf senkrecht zur ersten Laufrichtung mit Methanol:Chloroform = 1:9 (v/v). Der R_F -Wert des γ -Lactons betrug im Mittel 0,35. Die γ -Lacton-Zonen (Lokalisation im kurzwelligen UV-Licht) und die Leerwert-Zonen wurden ausgeschnitten und mit je 2 ml Äthanol eluiert. Nach Filtration durch Glasfritten G 4 wurde das Lösungsmittel evaporiert.

c) Zur Gaschromatographie des γ -Lactons wurde 3% OV-1 auf 100–120 mesh Chromosorb-W (Varian) in einer $180 \text{ cm} \times 0,3 \text{ cm}$ U-förmigen Glassäule und N_2 (55 ml/min) als Trägergas verwendet. Das Flammengemisch des Detektors bestand aus H_2 (35 ml/min) und Preßluft (200 ml/min). Die Temperatur des Säulenofens betrug 245°C , die des Injektors und des Detektors 300°C . Die Retentionszeit des γ -Lactons betrug unter diesen Bedingungen im Mittel 5 min. Vor jeder Meßreihe wurde die Trennsäule über Nacht unter Meßbedingungen konditioniert. Danach wurde bis zur konstanten Detektoranzeige γ -Lacton chromatographiert.

Das Eluat des Dünnschichtchromatogrammes wurde in 50 oder 100 μl Essigsäureäthylester gelöst. Dreimal 10 oder 20 μl dieser Lösung wurden zur Radioaktivitätsmessung entnommen (s. 1. e), und mindestens dreimal 3 μl wurden zur quantitativen Bestimmung in die Trennsäule injiziert (Hamilton-Spritze 10 μl). Zu jeder Meßreihe wurde eine Eichkurve aus mindestens 5 Punkten erstellt, wobei jeder Eichpunkt aus dem mittleren Ergebnis von mindestens 3 Injektionen resultierte. Die Abbildungen 6 und 7 zeigen typische Eichkurven. Als Maß der analysierten Aldosteronmenge diente der Flächeninhalt der Detektoranzeige über der Grundlinie. Voraussetzung für die Bewertung einer Analyse war es, daß bei der Chromatographie entsprechender Mengen des Leerwert-Eluates im Bereich des γ -Lactons keine Detektoranzeige erfolgte.

Die Sekretionsrate bzw. die Exkretionsrate von Aldosteron wurde aus dem Verhältnis der i. v. injizierten, bzw. der dem Sammelurin zugesetzten Radioaktivitätsmenge zu der entsprechenden spezifischen Radioaktivität des isolierten Aldosterons berechnet:

Sekretionsrate =

$$\frac{\text{injizierte } ^3\text{H-Radioaktivität } (\mu\text{Ci})}{\text{spezifische } ^3\text{H-Radioaktivität } (\mu\text{Ci}/\mu\text{g}) \cdot 3} (\mu\text{g Aldosteron/d})$$

Exkretionsrate =

$$\frac{\text{zugesetzte } ^{14}\text{C-Radioaktivität } (\mu\text{Ci})}{\text{spezifische } ^{14}\text{C-Radioaktivität } (\mu\text{Ci}/\mu\text{g}) \cdot 3} (\mu\text{g Aldosteron/d})$$

Ergebnisse und Diskussion

Spezifität der Methode

Als Kriterien der Spezifität der beschriebenen Methode können zunächst die Art der Isolierung des Aldosterons bzw. des γ -Lactons und die Art der quantitativen Analyse genannt werden. Die Alkaliwäsche des rohen Chloroformextraktes garantiert die weitgehende Entfernung der phenolischen Steroide und der Steroidsäuren. Die Papierchromatographie im Essigsäure-iso-amylester-System eignet sich ganz besonders für die

Isolierung des Aldosterons. Ein Großteil der Corticoidsteroid- und Corticosteroidderivate (11-Desoxycorticosteron, Corticosteron, 11-Dehydrocorticosteron, 11-Desoxycortisol, Cortisol, Cortison und deren Tetrahydroderivate wurden geprüft) zeigt in diesem System höhere Wanderungsgeschwindigkeiten als Aldosteron. Besondere Bedeutung kommt der Alkaliwäsche des Dichlormethanextraktes nach der Perjodsäure-Oxidation zu. Die γ -Lactonbildung ist spezifisch für Aldosteron. Andere Steroide mit α -Ketol-Seitenkette werden zu freien Äthensäuren oxidiert. Diese werden durch die Natronlauge ausgewaschen, während das γ -Lacton in der organischen Phase verbleibt. Die Gaschromatographie gewährleistet neben der Möglichkeit der quantitativen Auswertung einen zusätzlichen Selektionsschritt. Sie ermöglicht gleichzeitig eine qualitative Beurteilung des Meßwertes.

In diesem Zusammenhang muß allerdings darauf hingewiesen werden, daß die beschriebene Methode nur dann brauchbare Resultate liefert, wenn während der gesamten Prozedur höchste Reinheitskriterien eingehalten werden. Erste Analysen unter „normalen“ Laboratoriumsbedingungen ergaben außergewöhnlich hohe Werte für Sekretions- und Exkretionsraten, und im Wasser-Leerwert zeigte sich eine gaschromatographische Fraktion mit exakt der Retentionszeit des γ -Lactons (Abb. 1). Intensive Vorreinigung aller Lösungsmittel und Reagenzien führte nicht zur Lösung des Problems. Unterschiedliche Mengen der unspe-

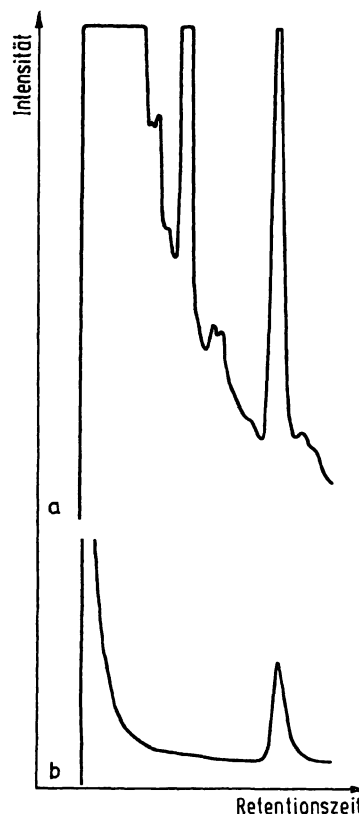


Abb. 2

Gaschromatographischer Nachweis der unspezifischen Verunreinigung (s. Abb. 1) im Essigsäureäthylester-Eluat eines menschlichen Fingerabdruckes. Elektrometerverschärkung: $2 \cdot 10^{-11}$ A/mV
a) Eluat des Fingerabdruckes. b) γ -Lacton-Standard, $2 \mu\text{l} = 8 \text{ ng}$

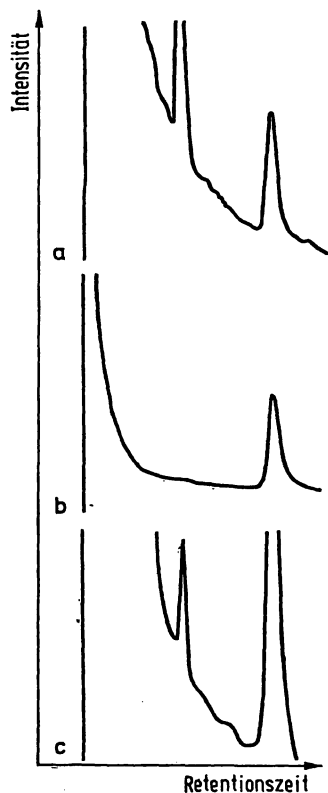


Abb. 1

Gaschromatographischer Nachweis einer unspezifischen Verunreinigung im Wasser-Leerwert mit den chromatographischen Eigenschaften des γ -Lactons. Elektrometerverschärkung: $2 \cdot 10^{-11}$ A/mV
a) Wasser-Leerwert, $3 \mu\text{l}$ aus $100 \mu\text{l}$ Endvolumen. b) γ -Lacton-Standard, $2 \mu\text{l} = 8 \text{ ng}$. c) Urin-Analysenprobe (SR 98), $3 \mu\text{l}$ aus $100 \mu\text{l}$ Endvolumen

zifischen Fraktion in parallel untersuchten Wasserproben deuteten darauf hin, daß es sich nicht um eine systematische, sondern um eine zufällige Verunreinigung handelte. Wir chromatographierten deshalb das Essigsäureäthylester-Eluat eines Fingerabdruckes und fanden in dieser Lösung eine hohe Konzentration der Verunreinigung mit den gaschromatographischen Eigenschaften des γ -Lactons (Abb. 2). In der Folgezeit wurde jede Berührung von Chromatogrammen mit der bloßen Hand peinlichst vermieden, und alle Glasgeräte wurden kurz vor Gebrauch mit destilliertem Chloroform gespült. Beispiele für den Erfolg dieser Maßnahmen zeigen die Abbildungen 3 und 4: Leerwert-Proben zeigten fortan keinerlei Detektoranzeige im Bereich des γ -Lactons, und die Ergebnisse aus Urinalysen lagen in plausiblen Größenordnungen. Bei Injektion einer Mischung aus Probe und Standard resultierte ein einheitlicher und symmetrischer Peak (Abb. 4).

Im Rahmen klinischer Routineuntersuchungen wurden 21 Aldosteronsekretionsraten (SR) und 26 Aldosteronexkretionsraten (ER) jeweils in Doppelbestimmung parallel nach der gaschromatographischen Methode (GLC) und nach der Tetrazolium-Blau-Methode (BT) bestimmt. Abbildung 5 zeigt den Vergleich der Ergebnisse. Mit

$$\text{SR}_{\text{GLC}} = 0,946 \cdot \text{SR}_{\text{BT}} - 16,1 \quad (r = 0,981)$$

und

$$\text{ER}_{\text{GLC}} = 0,966 \cdot \text{ER}_{\text{BT}} - 0,1 \quad (r = 0,947)$$

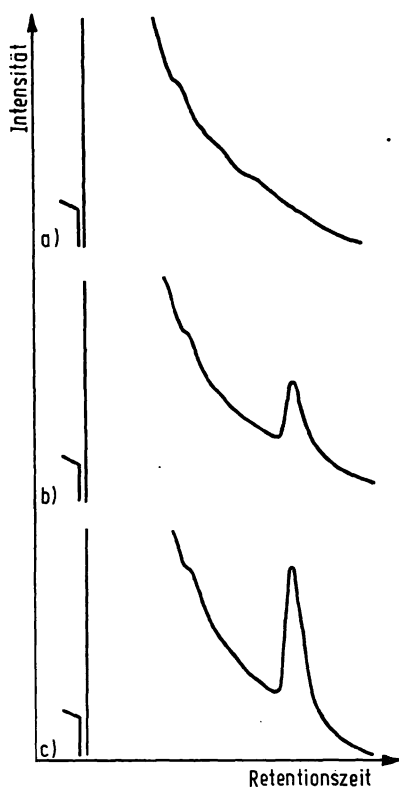


Abb. 3

Vermeidung der unspezifischen Verunreinigung durch erhöhte Sorgfalt bei der Probenaufbereitung. Elektrometerverschärkung: $2 \cdot 10^{-11}$ A/mV

a) Wasser-Leerwert, 3 μ l aus 100 μ l Endvolumen. b) γ -Lacton-Standard, 1 μ l = 4 ng. c) Urin-Analysenprobe (ER 78/l), 3 μ l aus 100 μ l Endvolumen

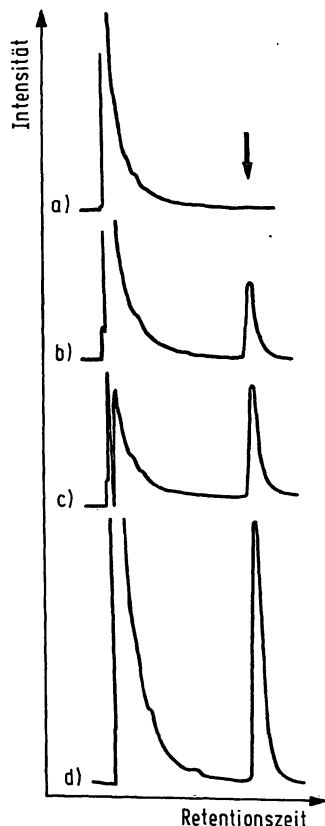


Abb. 4

Chromatographie bei Elektrometerverschärkung 10^{-10} A/mV.
a) Wasser-Leerwert, 3 μ l aus 100 μ l Endvolumen. b) γ -Lacton-Standard, 3 μ l = 60 ng. c) Urin-Analysenprobe (SR 192/l), 3 μ l aus 100 μ l Endvolumen. d) Mischung aus γ -Lacton-Standard (3 μ l) und SR 192/l (3 μ l)

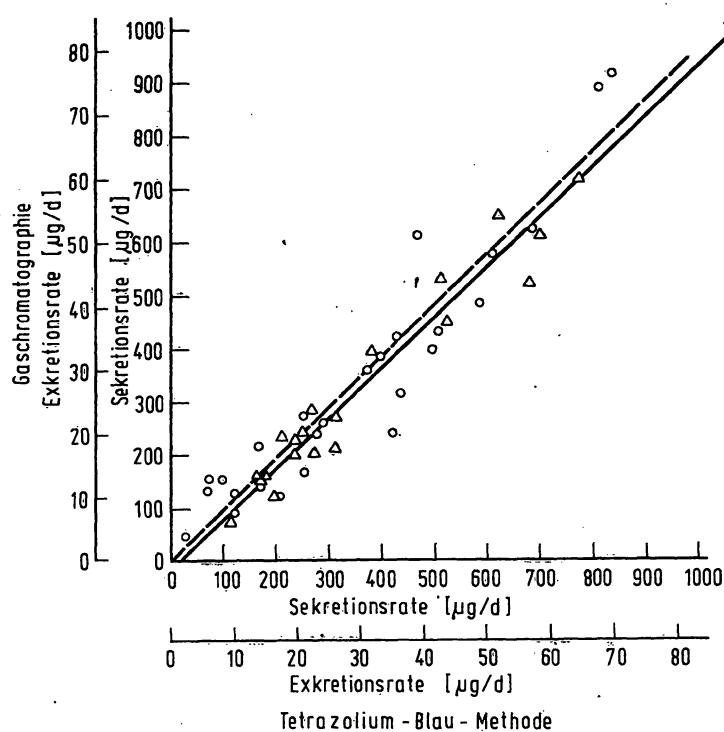


Abb. 5

Korrelation der Ergebnisse nach Parallelbestimmungen von Aldosteronsekretionsraten (SR, Δ , \rightarrow) und Aldosteronexkretionsraten (ER, \circ , ---) mit der gaschromatographischen Methode (GLC) und mit der Tetrazolium-Blau-Methode (BT)

$$ER_{GLC} = 0,966 \cdot ER_{BT} - 0,1; r = 0,947 (n = 26)$$

$$SR_{GLC} = 0,946 \cdot SR_{BT} - 16,1; r = 0,981 (n = 21)$$

ergab sich eine sehr gute Übereinstimmung bei hoch-signifikanter Korrelation.

Für eine Kontrollgruppe von 17 weiblichen und 18 männlichen Patienten mittleren Alters, die keinerlei Anzeichen kardiovaskulärer, renaler, hepatischer oder endokriner Erkrankungen zeigten, fanden wir mit der gaschromatographischen Methode eine mittlere Aldosteronsekretionsrate von 144 ± 86 (2s) μ g/d (51 bis 203 μ g/d) und eine mittlere Aldosteronexkretionsrate von $10,6 \pm 8,4$ (2s) μ g/d (5–20 μ g/d). Diese Ergebnisse stimmen mit den Normalwerten überein, die von zahlreichen Arbeitsgruppen unter Anwendung unterschiedlichster Methoden erstellt wurden (14).

Empfindlichkeit der Methode

Abbildung 6 zeigt eine typische Eichkurve bei einer empfindlichen Elektrometerverschärkung von $2 \cdot 10^{-11}$ A/mV (100% Schreiberausschlag = 1 mV). Die untere Nachweisgrenze liegt danach bei einer etwa 3 ng Aldosteron entsprechenden Menge γ -Lacton. Nimmt man ein üblicherweise eingesetztes Injektionsvolumen von 3 μ l aus 100 μ l Injektionslösung und stellt einen gesamten Aufarbeitungsverlust von 67% (Tab.) in Rechnung, so ließe sich bei Extraktion eines halben Tagesurines unter diesen Bedingungen noch eine Exkretionsrate von etwa 0,6 μ g bestimmen. Abbildung 3 zeigt typische Chromatogramme bei einer Elektrometerverschärkung von $2 \cdot 10^{-11}$ A/mV. Für die allgemeinen klinisch-diagnostischen Anforderungen genügt jedoch eine Elektrometerverschärkung von $1 \cdot 10^{-10}$ A/mV. Hierbei können 20 ng Aldosteron noch gut gemessen werden. Eine entsprechende Eichkurve zeigt

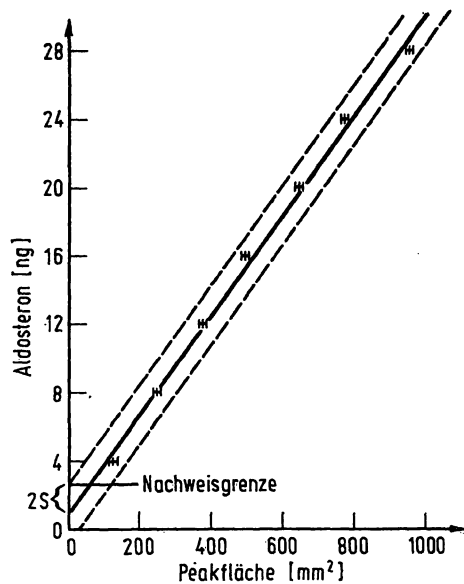


Abb. 6

Eichkurve für die gaschromatographische Aldosteronbestimmung als γ -Lacton bei Elektrometerverschärkung $2 \cdot 10^{-11}$ A/mV. Die γ -Lacton-Konzentration der Eichlösung (Essigsäureäthylester) entsprach 4 ng Aldosteron/ μ l. $\bar{x} \pm s$ (je 5 Injektionen)
 $0,029 \cdot \text{mm}^2 + 0,94 = \text{ng Aldosteron}$; $s_x = 0,87$; $r = 0,998$
 Nachweisgrenze: $0,94 + 2s_x = 2,68 \text{ ng}$

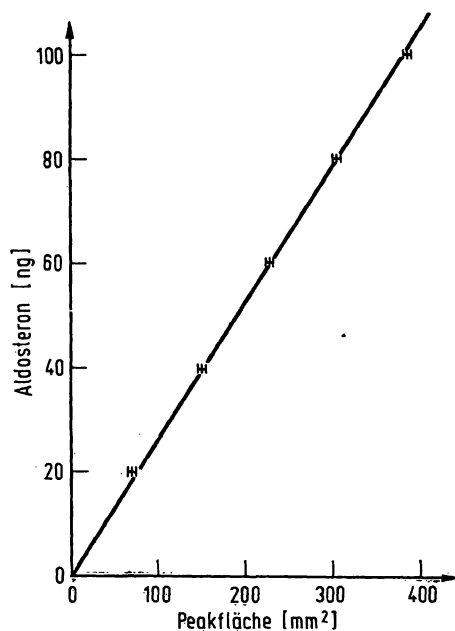


Abb. 7

Eichkurve für die gaschromatographische Aldosteronbestimmung als γ -Lacton bei Elektrometerverschärkung 10^{-10} A/mV. Die γ -Lacton-Konzentration der Eichlösung (Essigsäureäthylester) entsprach 20 ng Aldosteron/ μ l. $\bar{x} \pm s$ (je 5 Injektionen)
 $0,263 \cdot \text{mm}^2 + 0,411 = \text{ng Aldosteron}$; $r = 0,997$

Tab. 1

Wiederfindung zugesetzten $[4-^{14}\text{C}]$ D-Aldosterons aus 10 1000-ml-Aliquots eines Pool-Urines

	Mittlere Wiederfindung $\bar{x} \pm s$ (%)	Extremwerte (%)
Nach Hydrolyse, Extraktion und Papierchromatographie	$75,7 \pm 4,8$	68,2—82,4
Nach Perjodsäure-Oxidation	$41,7 \pm 2,8$	38,4—44,6
Nach Dünnschichtchromatographie	$33,3 \pm 2,7$	29,6—36,8

Abbildung 7. In der Praxis läßt sich die Eichkurve mit 3 Punkten noch zuverlässig erstellen. Abbildung 4 zeigt typische Chromatogramme bei einer Elektroverstärkung von $1 \cdot 10^{-10}$ A/mV.

Präzision der Methode

1. Präzision der Gaschromatographie:

Aus 30 statistisch ausgewählten Dreifachinjektionen von Meßproben aus Patienten-Urinen wurde der Variationskoeffizient für die entsprechende Detektoranzeige berechnet, indem das Ergebnis der Einzelinjektion in Prozent des entsprechenden Mittelwertes ausgedrückt wurde ($n = 90$). Der Variationskoeffizient betrug 2,8%.

2. Präzision der gesamten Methode:

a) 10 1500-ml-Portionen eines Pool-Urines wurden unabhängig voneinander in Doppelbestimmungen analysiert. Das mittlere Ergebnis war $7,85 \pm 0,93$ (s) μ g Aldosteron/1500 ml, entsprechend einem Variationskoeffizienten von 11,8%.

b) Aus Doppelbestimmungen von 24 statistisch ausgewählten Urinanalysen wurde der Variationskoeffizient für die entsprechenden Einzelergebnisse berechnet, indem jedes Einzelergebnis in Prozent des entsprechenden Mittelwertes ausgedrückt wurde ($n = 48$). Der Variationskoeffizient betrug 11,2%.

c) Sechs unterschiedliche Volumina eines Pool-Urines zwischen 500 und 2000 ml wurden unabhängig voneinander analysiert. Die Korrelation zwischen den bestimmten Aldosteronmengen und den eingesetzten Urinmengen ist in Abbildung 8 dargestellt. Sie ergab mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,999 ausgezeichnete Proportionalität.

Richtigkeit der Methode

11,0 μ g Aldosteron wurden in 1500 ml Wasser gelöst. Sechs dieser Wasserproben wurden unabhängig von-

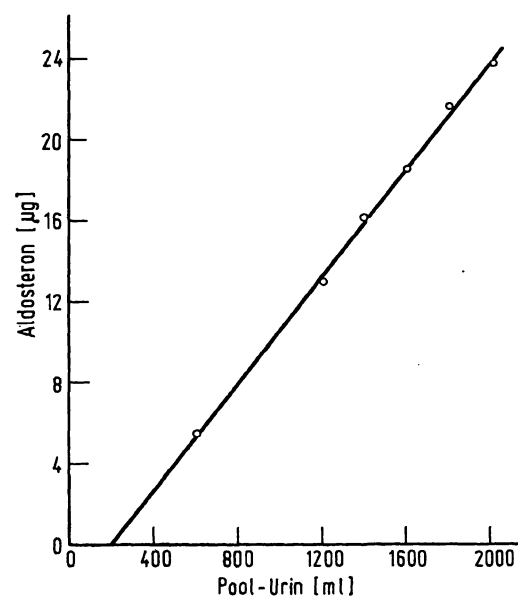


Abb. 8

Proportionalität der Ergebnisse bei Analyse unterschiedlicher Mengen eines Pool-Urines
 $0,013 \cdot \text{ml} - 2,65 = \mu\text{g Aldosteron}$; $r = 0,999$

einander in Doppelbestimmungen analysiert. Das mittlere Ergebnis betrug $10,23 \pm 0,66$ (s) μg , entsprechend einem Variationskoeffizienten von 6,5%.

Praktikabilität der Methode

Wie vorangehend nachgewiesen wurde, besitzt die beschriebene Methode eine Zuverlässigkeit, die nach dem heutigen Standard für derartig schwierige Untersuchungen als sehr gut bezeichnet werden kann.

Der Aufwand für die Isolierung des Hormones konnte aufgrund der gaschromatographischen Bestimmung als γ -Lacton auf eine Papierchromatographie und eine zweidimensionale Dünnschichtchromatographie reduziert werden. Eine technische Hilfskraft führt zur Zeit pro Woche 10 Aldosteronsekretions- und/oder -exkretionsratenbestimmungen in Doppelbestimmungen durch.

Mit radioimmunologischen Methoden (15–18) können im Idealfall erheblich größere Analysenzahlen bewältigt werden. Leider ist es nur in seltenen Fällen gelungen (19), tatsächlich spezifische Antikörper gegen Aldosteron zu gewinnen. Nach dem heutigen Stand der Entwicklung setzt auch die radioimmunologische Technik einen erheblichen Aufwand an chromatographischer Vorreinigung voraus und bietet deshalb vorerst nur unwesentliche Vorteile gegenüber gaschromatographischen Techniken. Bis zur Entwicklung höher spezifischer Antikörper werden gaschromatographische Methoden auch weiterhin, zumindest aber als Referenzmethoden, ihre volle Berechtigung beibehalten. Ein großer Vorteil der Gaschromatographie gegenüber dem Radioimmunoassay besteht in der Möglichkeit, die Zuverlässigkeit jeder einzelnen Analyse anhand von Lage und Form des Probenpeaks jederzeit zu beurteilen.

Korrelation zwischen Sekretionsrate (SR) und Exkretionsrate (ER)

Bei einem Kontrollkollektiv von 35 Patienten ohne Anzeichen kardiovaskulärer, renaler, hepatischer oder endokriner Erkrankungen, sowie bei 86 Patienten mit Verdacht auf Hyperaldosteronismus und einem Patienten nach subtotaler Adrenalectomie wurden gleichzeitig Sekretionsrate und Exkretionsrate bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 zusammengefaßt. Zwischen Sekretionsrate und Exkretionsrate ergab sich ein Zusammenhang gemäß $SR = 13,58 \cdot ER + 53,74$ mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,792$. Damit besteht zwischen Sekretionsrate und Exkretionsrate eine signifikante Korrelation. Es fällt jedoch auf, daß 18 von 60 Fällen mit normaler Exkretionsrate (innerhalb des $\pm 2s$ -Bereiches der Kontrollgruppe) erhöhte Sekretionsraten zeigten (30%). Von 40 Fällen mit normaler Sekretionsrate zeigte dagegen nur einer für die Exkretionsrate einen Wert, der geringfügig über der entsprechenden $+2s$ -Grenze lag.

Diese Befunde lassen sich, was zunächst naheliegender erscheint, nicht mit Radioaktivitätsverlusten bei der

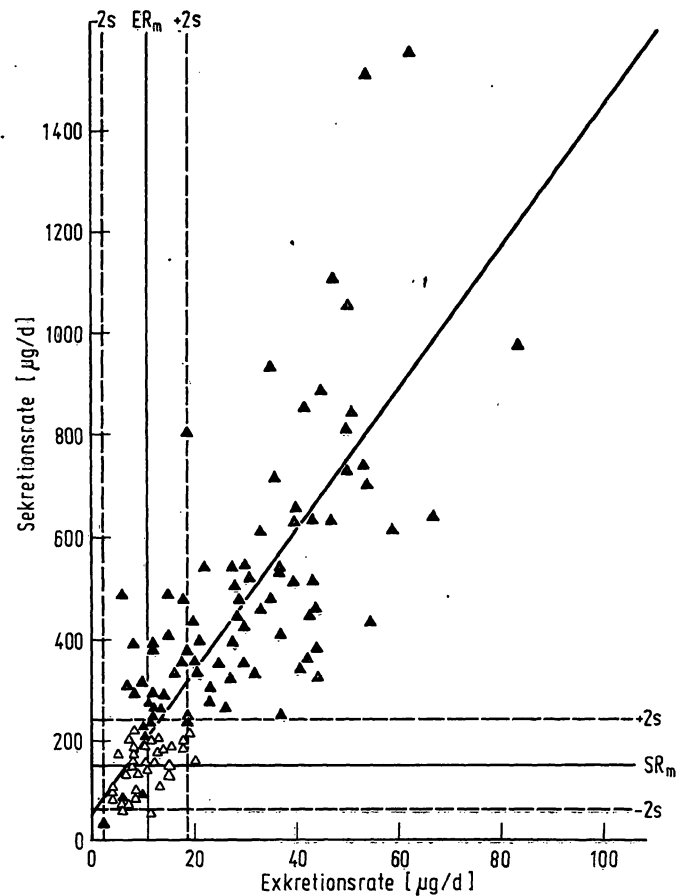


Abb. 9
Korrelation zwischen Aldosteronsekretionsraten (SR) und -exkretionsraten (ER). Δ : Kontrollgruppe; \blacktriangle : Patienten mit Verdacht auf Hyperaldosteronismus
 $SR = 13,58 \cdot ER + 53,7$; $r = 0,792$ ($n = 122$)

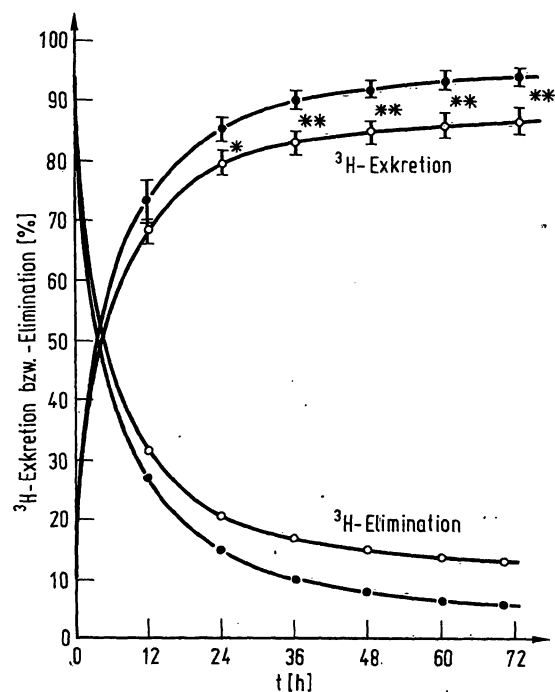


Abb. 10
Zeitlicher Verlauf der renalen ^3H -Exkretion nach i. v. Injektion von ^3H -Aldosteron (100%), sowie der ^3H -Elimination aus dem Körper über die Nieren (Elimination = 100% — Exkretion) bei normaler (\bullet , $SR < 200 \mu\text{g/d}$, $n = 10$) und erhöhter (\circ , $SR > 350 \mu\text{g/d}$, $n = 10$) Sekretionsrate. * $0,05 > P$, ** $0,01 > P$

VERLAG CHEMIE

Endlich wieder lieferbar — jetzt in 2., verbesserter Auflage!

Georg Iwantschew

Das Dithizon und seine Anwendung in der Mikro- und Spurenanalyse

Es war eine glückliche Fügung, als 1925 Hellmuth Fischer das Diphenylthiocarbazon (Dithizon) in die analytische Praxis einführte. Seitdem ist es das bedeutendste colorimetrische Extraktionsreagens geblieben — ausgezeichnet durch eine kaum zu übertreffende Reaktionsempfindlichkeit, Reaktionsbreite und zugleich Einstellmöglichkeit für hohe Trennschärfen.

Während die instrumentellen Verfahren (Spektralanalyse, Röntgenfluoreszenz, Atomabsorption usw.) aufgrund ihrer Schnelligkeit die großen innerbetrieblichen Serienanalysen übernommen haben, ist das Dithizon für die Eichung, Kontrolle, Schiedsanalyse und für exakte kleine Serien die Methode der Wahl.

Mit Dithizon läßt sich der Großteil der Biogifte auf der Basis von Metallen und deren Organylverbindungen (Fungizide) im Spurenbereich erfassen, so daß dem Dithizon für den Umweltschutz eine bedeutende Schlüsselaufgabe zugewachsen ist. Neben dem Spurenanalytiker allgemein werden in Zukunft auch der Biologe und Arzt zunehmend auf Dithizonmethoden zurückgreifen.

Fortschritte bei der Kontrolle der Reinheit von Solventien haben zur Stabilität der Reagenslösungen beigetragen.

Das Buch ist als Ratgeber für die analytische Praxis ausgelegt und als Grundlage für die Weiterentwicklung der reinen

und der kombinierten (z. B. Chromatographie, Atomabsorption) Verfahren mit Dithizon.

Die jetzt vorliegende 2. Auflage des bekannten Standardwerkes wurde vom Autor selbst besorgt, und das Buch liegt nun in einer auf den neuesten Stand gebrachten Bearbeitung vor.

1972. 2., verbesserte Auflage. XVI, 330 Seiten mit 41 Abbildungen und 18 Tabellen.
Format 17 × 24 cm. Leinen DM 118,—.

Ein Sonderprospekt steht zur Verfügung.

VERLAG CHEMIE GMBH
694 WEINHEIM/BERGSTR.

**IM DIENSTE
DER
GESUNDHEIT**

BEHRINGWERKE AG
MARBURG-LAHN

S. Behring

Als namhaftes Unternehmen der pharmazeutischen Industrie befassen wird uns mit der Entwicklung und Produktion immunbiologischer Präparate.

Im Rahmen des Ausbaues unserer Forschungsabteilung für Humanvirologie suchen wir

Virologen, Mikrobiologen und Biochemiker

die auf dem Gebiet der Virologie gearbeitet haben oder entsprechende Vorkenntnisse besitzen, als

wissenschaftliche Mitarbeiter

Ihnen bietet sich die Möglichkeit, die vielseitigen und interessanten Aufgaben bei der Entwicklung neuer Produkte kennenzulernen.

Durch Zusammenarbeit mit Instituten und Teilnahme an wissenschaftlichen Tagungen können Sie Ihre Kenntnisse ergänzen und vertiefen.

Selbstverständlich ermöglichen wir Ihnen eine gründliche Einarbeitung in Ihr künftiges Forschungsgebiet. Neben einer der qualifizierten Tätigkeit entsprechenden Dotierung gewähren wir alle sozialen Leistungen eines modernen Großunternehmens. Sie finden gutes Betriebsklima und einen jungen aufgeschlossenen Kollegenkreis.

Bei der Wohnungsbeschaffung in der landschaftlich reizvoll gelegenen Universitätsstadt Marburg sind wir Ihnen behilflich.

Sind Sie interessiert, dann wenden Sie sich bitte kurz schriftlich an unsere Personalabteilung.

Behringwerke Aktiengesellschaft

355 Marburg a. d. Lahn, Postfach 1130

BIOCHIMIE

Edité par la Société de Chimie Biologique

tel est le titre
sous lequel paraîtra à partir de 1971

le „BULLETIN DE LA SOCIÉTÉ DE CHIMIE BIOLOGIQUE“

SECRÉTARIAT

de la Société de Chimie Biologique

J. P. EBEL, Secrétaire Général (Relations Extérieures)
R. PERLES, Secrétaire Général

REDACTION

F. GROS, Secrétaire scientifique
F. PERCHERON, Secrétaire à la Publication
J. NUNEZ, Secrétaire à l'Information
Y. RAOUL, Secrétaire à l'Edition

SECRETARIAT et REDACTION: 4 Avenue de l'Observatoire, PARIS 6°

12 FASCICULES

ABONNEMENTS: FRANCE et ZONE FRANC: 150 ffrcs • BELGIQUE: 1.687,— ffrcs • AUTRES PAYS: 186,— ffrcs

MASSON et Cie, Editeurs • 120 Boulevard St Germain • PARIS 6ème



Walter de Gruyter Berlin • New York

Karl Höll

Water

Examination • Assessment • Conditioning
Chemistry • Bacteriology • Biology
With the collaboration of Helmut Peter
and Dietrich Lüdemann

Translated from the 5th German edition
by Professor M. R. F. Ashworth,
Department of Organic Analysis,
University of the Saar, W. Germany

1972. XVIII + 389 pages.
With 24 diagrams in 129 figures.
Bound DM 76,—
ISBN 3 11 003728 9

Karl Höll

Wasser

Untersuchung • Beurteilung • Auf-
bereitung • Chemie • Bakteriologie
Biologie

5., völlig neubearb. u. erw. Aufl.
Mit 24 Abb. in 129 Einzeldarstellungen.
Gr.-Okt. XX, 423 S. 1970. Geb. DM 52,—

Eckhart Buddecke

Grundriß der Biochemie

Für Studierende der Medizin, Zahn-
medizin und Naturwissenschaften

3., neubearb. Aufl. Gr.-Okt. XXXII,
515 S. Mit mehr als 400 Formeln, Tab.
und Diagrammen. 1973. Plastik flexibel
DM 29,50 ISBN 3 11 0044315
(de Gruyter Lehrbuch)

Günther Kraft

Joseph Fischer

Indikation von Titrationen

Okt. XII, 300 S. Mit 124 Abb. und
4 S. Tabellen. 1972. Plastik flexibel
DM 58,— ISBN 3 11 001625 7
(Arbeitsmethoden der modernen
Naturwissenschaften)

Urinsammlung erklären, da in allen Fällen mehr als 80% der injizierten Radioaktivität im Sammelurin wiedergefunden wurden.

Untersuchungen über den zeitlichen Verlauf der Ausscheidung der gesamten Radioaktivität bei 10 Patienten mit Sekretionsrate $< 200 \mu\text{g/d}$ und 10 Patienten mit Sekretionsrate $> 350 \mu\text{g/d}$ ergaben eine signifikant langsamere Ausscheidung bei den Patienten mit erhöhter Sekretionsrate (Abb. 10). Die Analyse der mittleren Eliminationskurven (zusammengesetzte Exponentialfunktionen) in halblogarithmischer Darstellung (Abb. 11) ergab jeweils mindestens drei Exkretionsfraktionen für das injizierte ^3H -Aldosteron.

Dabei deutete sich bei Patienten mit erhöhter Sekretionsrate eine relative Verkleinerung der am schnellsten eliminierten Fraktion an. Diese rasch eliminierte Fraktion entspricht mit großer Wahrscheinlichkeit der für die Analyse des Aldosteron-18-glucuronides verwendeten säurelabilen Fraktion (20). Die festgestellte Divergenz zwischen normaler Exkretionsrate und erhöhter Sekretionsrate könnte demnach aus einer Veränderung im Muster der ausgeschiedenen Aldosteron-metaboliten bei erhöhter Aldosteron-Plasmakonzentration resultieren. Die endgültige Klärung dieser Fragestellung bedarf jedoch zweifellos weiterer eingehender Untersuchungen.

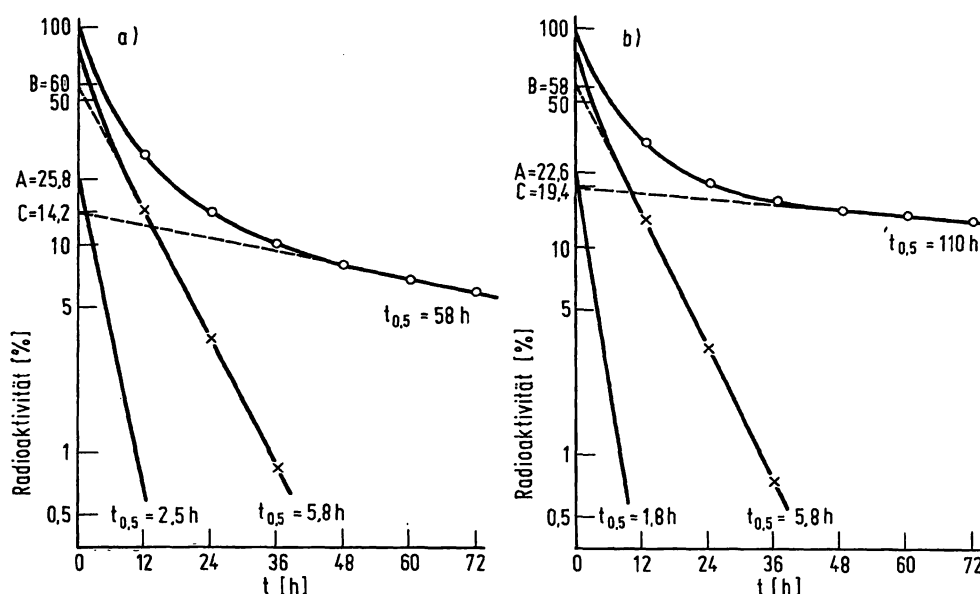


Abb. 11

Die graphische Analyse der ^3H -Eliminationskurven aus Abbildung 10 in halblogarithmischer Darstellung ergab als Kurvenfunktion jeweils eine Summe aus 3 negativen Exponentialfunktionen: Radioaktivität (R_a) = $A \cdot e^{-\alpha t} + B \cdot e^{-\beta t} + C \cdot e^{-\gamma t}$. Jede dieser drei Einzelfunktionen entspricht einer ^3H -Fraktion der Größe A, B oder C (%), die entsprechend einer Geschwindigkeitskonstanten α , β oder γ (1/h) über die Nieren eliminiert wird.

- a) Sekretionsrate $< 200 \mu\text{g/d}$: $R_a = 25,8 \cdot e^{-0,277t} + 60 \cdot e^{-0,120t} + 14,2 \cdot e^{-0,012t}$
 b) Sekretionsrate $> 350 \mu\text{g/d}$: $R_a = 22,6 \cdot e^{-0,378t} + 58 \cdot e^{-0,120t} + 19,4 \cdot e^{-0,009t}$

Literatur

- MERITS, I. (1962), J. Lipid Res. 3, 126—127. — 2. RAPP, J. P. & EIK-NES, K. B. (1965), J. Gas Chromatogr. 3, 235—237. — 3. RAPP, J. P. & EIK-NES, K. B. (1966), Anal. Biochem. 15, 386—408. — 4. BRAVO, E. L. & TRAVIS, H. R. (1967), J. Clin. Lab. Med. 70, 831—840. — 5. SALOKANGAS, A. & ADLERCREUTZ, H. (1967), Acta Endocr. Suppl. 119, 97. — 6. AAKVAAG, A. (1967), Acta Endocr. Suppl. 119, 96. — 7. NICOLIS, G. L., WOTIZ, H. H. & GABRILOVE, L. (1968), J. Clin. Endocrin. Metab. 28, 547—557. — 8. FABRE, L. F. jr., FENIMORE, D. C., FARMER, R. W., DAVIS, H. W. & FARRELL, G. (1969), J. Chromatogr. Sci. 7, 632—638. — 9. PALEM-VLIERS, M., LAPIERE, C. L. & GENARD, P. (1970), Excerpta Medica Foundation, Intern. Congr. Ser. 210, 99. — 10. LEUNG, F. Y. & GRIFFITHS, J. (1972), Clin. Chim. Acta 37, 423—432. — 11. LOMMER, D. unveröffentlicht. — 12. VECSEI, P. & LOMMER, D. unveröffentlicht. — 13. NOWACZYNSKI, W. J., GOLDNER, M. & GENEST, J. (1955), J. Clin. Lab. Med. 45, 818—821. — 14. GLAZ, E. & VECSEI, P. (1971), Aldosterone. S. 29—32, Akadémiai Kiadó, Budapest (joint edition with Pergamon Press, Oxford 1971). — 15. MAYES, D., FURUYAMA, S., KEM, D. C. & NUGENT, C. A. (1970), J. Clin. Endocrinol. Metab. 30, 682—685. — 16. BAYARD, F., BEITINS, I. S., KOWARSKI, A. & MIGEON, C. J. (1970), J. Clin. Endocrinol. Metab. 31, 507—510. — 17. KATZ, F. H., SIMET, B. S., ZIMMERING, B. S. & KELLY, W. G. (1970), Proc. 52nd Mtg. Endocr. Soc. 54, 63. — 18. FARMER, R. W., ROUP, W. G. jr., PELLIZZARI, E. D. & FABRE, L. F. jr. (1972), J. Clin. Endocrinol. Metab. 34, 18—22. — 19. VETTER, W., FREEDLENDER, E. & HABER, E. (1972), Acta Endocr. Suppl. 159, 32. — 20. NEHER, R. (1962), Symp. Dt. Ges. f. Endokrinol. 9, 21—39.

Prof. Dr. D. Lommer
 I. Medizinische Klinik und Poliklinik der
 Johannes Gutenberg-Universität
 65 Mainz
 Langenbeckstr. 1